SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. C227

LC-MS

LCMS™-8060NX を用いたヒト血清中テストステロンの超高感度分析

本稿では、トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060NX を用いた血清中テストステロンの超高感度分析例をご紹介します。標準試料を用いた検量線では 0.05～1000 pg/mL の濃度範囲で直線性が得られ（R^2=0.9996）、定量下限値における濃度%RSD は 2.47 %、各検量点における正確さは 94.64～111.04 %と良好な値が得られました。また、テストステロンを添加したヒト血清由来サンプル（1 pg/mL）の真度は 105 %となり、今回用いた手法が実検体においても有効であることが確認されました。

N. Kato, Y. Inohana

■はじめに

テストステロン（図 1）は精巣や副腎などで産生されるアンドロゲンで筋肉および骨格の成長促進、造血作用等に寄与するステロイドホルモンです。血中の遊離テストステロン値はクッシング症候群や腫瘍など数多くの疾病に対するバイオマーカーであり、臨床的にも重要な役割を担っています。テストステロンの血中濃度を測定する手法としては、イムノアッセイ法が主に用いられてきましたが、構造が類似したステロイドホルモンによる交差反応性に苦慮することがあります。一方で LC/MS/MS を用いた場合には、その選択性の高さにより従来法がもつ問題点を回避し、より正確な定量を行うことができるため、臨床分野での活用が期待されています。

本稿では、LCMS-8060NX を用いて高感度に血清中テストステロンを定量分析した測定例を紹介します。

■試料調製

標準試料は 50 %メタノールで段階希釈を行い、0.05～1000 pg/mL に調製したものを検量線作成に用いました。

血清添加試料では、市販の脱ステロイド処理されたヒト血清を用い、血清中テストステロン濃度が 1 pg/mL となるように添加しました。血清 100 µL に、標準試料および内部標準試料とヘキサン：酢酸エチル=9：1 を加え十分に振とう、10 分間遠心分離後、有機溶媒層を蒸発乾固し 50 %メタノールで再溶解しました。

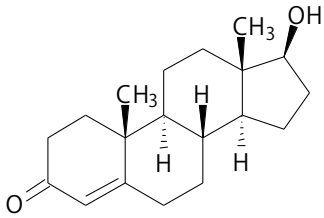

図 1　テストステロンの構造式

■分析条件

HPLC と MS の分析条件を表 1 に示しました。また MRM トランジションを表 2 に示しました。

表 1　分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)	
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120, 50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm*1
Mobile phases	: A) 0.05 mM NH_4F in water B) methanol
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.3 mL/min
Injection volume	: 25 µL
[MS conditions] (LCMS-8060NX)	
Ionization	: ESI (Positive mode)
Mode	: MRM
Interface voltage	: 1 kV
IonFocus voltage	: 3 kV
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 15.0 L/min
Heating gas flow	: 15.0 L/min
DL temp.	: 250 ℃
Block heater temp.	: 500 ℃
Interface temp.	: 350 ℃
Probe position	: +1.5

*1 : P/N 227-31012-03

表 2　MRM トランジション

Compound	Precursor *m/z*	Product *m/z*
Testosterone	289.25	97.15
Testosterone-[13C3]	292.25	100.20

■検量線

標準試料を用いた検量線（内部標準法、各濃度 n=3）では、0.05～1000 pg/mL で寄与率 R^2=0.9996 となり、幅広いダイナミックレンジで良好な直線性が得られました。定量下限値 0.05 pg/mL における濃度%RSD は 2.47 %、各検量点の正確さは 94.64～111.04 %となりました。図 2 に検量線を、図 3 に標準溶液 0.05 pg/mL の MRM クロマトグラムを示しました。

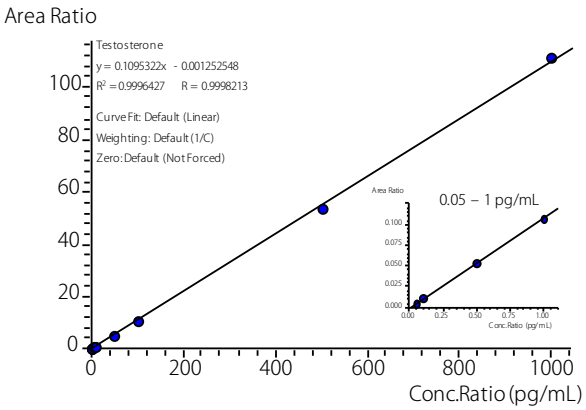

図 2　検量線（0.05–1000 pg/mL）

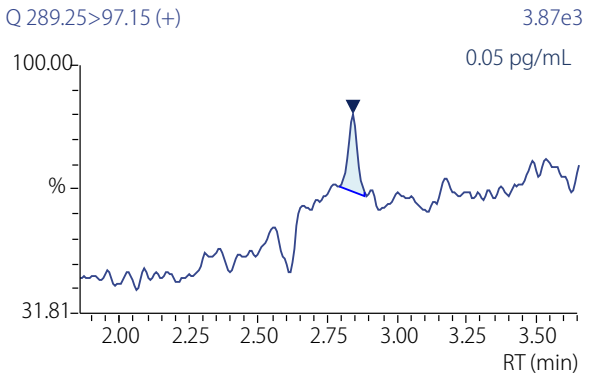

図 3　MRM クロマトグラム（neat STD：0.05 pg/mL）

■ヒト血清添加試料

前処理後試料を測定して得られた面積値から、図 2 に示した検量線を用いて濃度計算したところ、血清中の添加濃度 1 pg/mL に対して n=3 平均値で 1.05 pg/mL となり良好な結果が得られました。図 4 にヒト血清添加試料の MRM クロマトグラムを示しました。

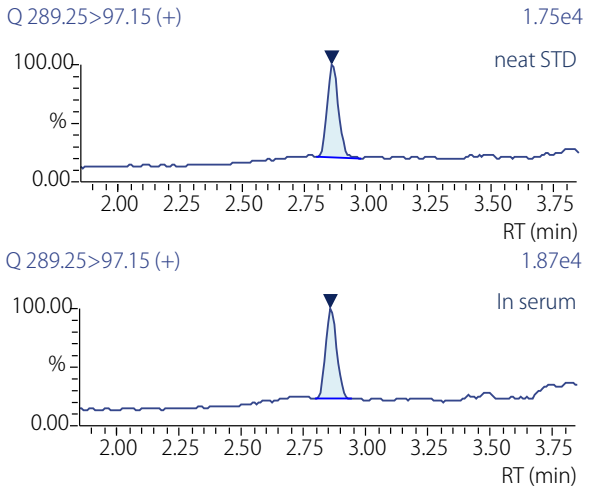

図 4　MRM クロマトグラム　1 pg/mL
（上段：neat STD、下段：ヒト血清添加試料）

■まとめ

LCMS-8060NX を用いて、テストステロンの定量分析を行いました。その結果、0.05～1000 pg/mL という低濃度から幅広い濃度レンジでの定量分析が可能であり、ヒト血清への添加試料においても良好な真度が得られることが確認されました。

LCMS、Nexera、および Shim-pack Scepter は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
初版発行：2020 年 9 月
島津コールセンター 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm
会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。